

⑲ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

① N° de publication : 2 805 270

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

② N° d'enregistrement national : 00 06272

⑤ Int Cl<sup>7</sup> : C 08 F 8/44, C 08 F 16/06, C 08 B 37/00, A 61 K 47/30, 7/00, 48/00

⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 17.05.00.

③③ Priorité : 21 02.00 FR 00002102.

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 24.08.01 Bulletin 01/34.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

①① Demandeur(s) : BIOVECTOR THERAPEUTICS S.A.  
Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : DE MIGUEL IGNACIO, RIEUMAJOU  
VALERIE, KRAVTZOFF ROGER et BETBETDER  
DIDIER.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU

⑤④ POLYMERES ET MATRICES CATIONIQUES BIOELIMINABLES A DEGRADATION CONTROLEE.

⑤⑦ La présente invention concerne de nouveaux types de polymères et matrices polymériques cationiques, dégradables dans l'organisme, et à vitesse de dégradation contrôlée, utilisables en tant que tels ou comme vecteurs de différents composés, en particulier des molécules à activité biologique. Elle se rapporte également à un procédé de fabrication de tels polymères ou matrices.

FR 2 805 270 - A1



La présente invention concerne de nouveaux types de polymères ou matrices  
5 polymériques cationiques, dégradables dans l'organisme, et à vitesse de dégradation contrôlée, utilisables en tant que tels ou comme vecteurs de différents composés, en particulier des molécules à activité biologique. Elle se rapporte également à un procédé de fabrication de tels polymères ou matrices.

Les polymères cationiques sont extrêmement utiles dans les domaines  
10 pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires. En effet, la charge positive portée par de tels polymères leur permet de présenter les propriétés suivantes :

- des propriétés de bioadhésion (en particulier aux membranes biologiques et aux muqueuses) et de complexation,
- des propriétés de transport et de protection de substances  
15 diverses,
- des propriétés d'amélioration des réponses immunitaires.

Ces propriétés sont observées pour tous les types de polymères cationiques, indépendamment des autres fonctionnalités (en particulier la réticulation), et/ou de leur forme (micro- ou nano- particules, films, patches...).

20 L'utilisation de ligands cationiques résulte en une charge positive du polymère, ce qui permet de stabiliser de nombreux principes actifs. En effet, beaucoup de molécules ayant une activité biologique portent des charges globales négatives et leur association avec la matrice polymérique est améliorée par les charges positives. Les polymères cationiques sont donc très intéressants pour le  
25 transport et la protection de molécules chargées négativement.

Par ailleurs, la bioadhésion se traduit par une propriété de mucoadhésion et par une propriété d'interaction de ces polymères avec des membranes biologiques. On peut donc transporter un principe actif et l'amener de façon préférentielle à pénétrer ou rester en contact avec une muqueuse ou une membrane cellulaire.

30 Ainsi, des polymères naturels cationiques comme le chitosan sont utilisés pour améliorer l'administration de substances par voie mucoale (principalement nasale ou vaginale), c'est le cas par exemple de peptides comme l'insuline (Illum et al. *Pharm. Res.* (1994) 11, p1160, Feit et al. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (1998) 24,

p979). Dans le cas de particules de poly  $\epsilon$  caprolactone recouvertes de chitosan ou du polymère cationique poly-L-lysine, la couche cationique mucoadhésive ainsi obtenue permet d'augmenter la pénétration dans la cornée des substances actives transportées par ces systèmes de délivrance oculaire (Int. J. Pharmaceutics (1997) 5 153, p41). Des particules cationiques à base de polysaccharide fonctionnalisé avec des fonctions ammonium quaternaire (EP 687 173) ont été décrites comme possédant une importante capacité de résidence dans la muqueuse nasale (Kravtsoff et al. *Proceed. Int'l. Symp. Control Rel Bioact. Mater* (1998) 25, p818). Ces mêmes nanoparticules sont capables de transporter des médicaments de charge 10 opposée, de les protéger et d'améliorer leur efficacité, par exemple dans le cas d'oligonucléotides antisens (WO 98/29557). Des polymères cationiques comme par exemple les dendrimères de polyéthylèneimine ont montré leur capacité à transporter et à protéger de l'ADN et à améliorer sa pénétration cellulaire, ainsi que le niveau de transfection obtenu (O. Boussif et al. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 15 92, p7297).

Par ailleurs, que ce soit pour le chitosan ou pour les polymères cationiques décrits précédemment, il a été montré que leur adjonction à des antigènes vaccinaux permet d'améliorer et même d'induire des réponses immunitaires tout à fait acceptables quand ils sont administrés par voie nasale (WO 97/20576, WO 20 98/29099). L'amélioration de réponses immunitaires obtenues par voie injectable a été par ailleurs décrite pour plusieurs polymères polyioniques, anioniques ou cationiques (Paine et al. *Vaccine* (1998) 16, p92). Cependant, l'effet d'induction de réponses immunitaires par voie mucosale a été principalement décrit pour des polymères cationiques.

25 Il semble dans ce cas, que les polymères possédant des fonctions cationiques type ammonium quaternaire soient plus efficaces que les polymères possédant des fonctions amine primaires (comme le chitosan) où le degré d'ionisation des fonctions aminées est très dépendant du pH.

On connaît des procédés de greffage de ligands cationiques, par exemple 30 ceux décrits dans le brevet européen EP 687 173, qui concernent un greffage de charges positives (ammoniums quaternaires) sur des polysaccharides par réaction avec le glycidyltriméthylammonium (GTMA). On peut aussi citer les méthodes de quaternisation du chitosan (Kotze et al. *Pharm Res* (1991), 14, p1197).

Toutefois la plupart des procédés actuels de greffage de charges positives à un squelette polymérique ne sont pas totalement satisfaisants pour leur utilisation en pratique, dans la mesure où les liaisons (polymère – ligand ionique) ne sont pas facilement biodégradables. Ainsi, les greffages par l'intermédiaire de liaisons éther  
5 ou amide sont stables, et l'élimination d'un polymère ainsi chargé peut s'avérer difficile, en particulier dans le cas d'une utilisation parentérale.

D'autres polymères polysaccharidiques ont aussi été développés, pour des applications alimentaires, en particulier anti-cholestérol (EP 319 645). Dans ce cadre, la propriété thérapeutique recherchée provient d'un effet séquestrant  
10 irréversible des sels biliaires et la propriété de biodégradabilité serait plutôt gênante.

Ainsi, il existe un besoin de définir de nouveaux types de polymères, qui soient chargés positivement, mais néanmoins facilement dégradables dans l'organisme et qui donnent naissance à des produits de dégradation non toxiques ou naturels, eux mêmes biodégradables, bioéliminables ou bioassimilables.

15 La Demandresse se propose de répondre à cette demande en proposant un nouveau type de polymères cationiques, pour lesquels la liaison (squelette polymérique) – (ligand cationique) est une liaison labile qui peut être hydrolysée *in vivo* ou dans des conditions physiologiques, la vitesse de dégradation étant modulable en fonction du ligand utilisé.

20 Ces polymères sont facilement éliminés de l'organisme après administration parentérale et leur dégradation peut être modulée entre quelques heures et quelques semaines. La dégradation de ces polymères conduit à des produits non toxiques, complètement bioéliminables ou bioassimilables. Les problèmes liés à la toxicité à long terme ou à l'accumulation du produit dans l'organisme devraient être  
25 supprimés.

Pour des applications thérapeutiques, la notion de dégradation est mieux adaptée que la notion de biodégradation. En effet, la biodégradation implique que des systèmes enzymatiques appropriés soient présents à l'endroit où le polymère ou le système polymérique doit être dégradé. La biodégradation est alors dépendante  
30 de facteurs comme le site d'injection ou le site d'accumulation du produit. Si l'on recherche une dégradation contrôlée et prévisible, l'homme du métier préférera des systèmes de stabilité connue, où la dégradation est le résultat d'une cinétique

d'hydrolyse chimique spontanée, indépendante de tout autre facteur et connue d'avance (Vert. *Proceed. Int'l Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* (1999) 26, p228).

Dans le cas des polymères selon l'invention, les systèmes de dégradation biologiques peuvent également participer à accélérer le processus de dégradation  
5 mais quel que soit l'impact de leur participation, on peut être sûr que le système se dégradera par lui-même.

Les polymères selon l'invention ont été conçus avec l'avantage fondamental que la vitesse de dégradation « in vitro » et « in vivo » peut être modulée par le type de greffon utilisé.

10 Afin d'assurer l'élimination de ces polymères cationiques il est entendu que le squelette polymérique de base ayant servi de support au greffage de la charge cationique, doit être lui-même biorésorbable, biodégradable ou bioéliminable. Par ailleurs, et comme cela sera précisé plus loin, le squelette polymérique possède des fonctions hydroxyle (– OH) libres, ce qui lui donne un caractère « polyhydroxylé ».

15 Par « hydrolysable, *in vivo*, ou en milieu physiologique », on entend que les liaisons sont dégradées lorsqu'on les soumet à des conditions semblables à celles rencontrées *in vivo* en milieu physiologique, à savoir à un pH compris entre 6,8 et 7,7 et à une température comprise entre 36,7 °C et 37,4 °C. Les conditions physiologiques concernent en général un pH d'environ 7,4 et une température  
20 d'environ 37 °C. Toutefois, il est important de noter que les conditions physiologiques peuvent être variables en fonction du site et de la voie d'administration. En effet, si l'on peut considérer que la température est voisine de 37 °C, le pH et la force ionique sont très variables en fonction de la voie d'administration.

25 Ainsi la présente invention concerne des polymères polyhydroxylés sur lesquels sont greffés des ligands cationiques contenant en outre au moins une fonction carboxyle, par l'intermédiaire d'une liaison ester entre ladite fonction carboxyle du ligand et un groupement hydroxyle de ladite matrice polyhydroxylée. Cette liaison est une liaison labile qui est hydrolysable en milieu physiologique.  
30 Ceci assure la bioélimination du polymère cationique obtenu.

Le procédé de préparation d'un tel polymère cationique fait également partie de l'invention.

L'utilisation de réactifs non toxiques pour la fabrication de ces polymères permet d'obtenir également des produits de dégradation non toxiques, ce qui est un élément très important en particulier pour l'industrie pharmaceutique.

La liaison labile ( matrice ligands ) hydrolysable en milieu physiologique est donc, de manière préférée, une liaison ester entre les groupements hydroxyles des monomères constituant la matrice polymérique polyhydroxylée et les ligands.

La présence de charges cationiques sur les ligands assure la labilité de la liaison, par déstabilisation de la fonction ester due à l'effet électroattracteur de la charge positive. De manière préférée, les ligands cationiques utilisés portent la charge positive par l'intermédiaire de fonctions ammoniums quaternaires.

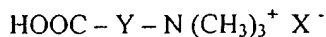
Une mise en œuvre particulière de la présente invention utilise les ligands répondant à la formule (1) définie ci-dessous, afin de réaliser le greffage de charges cationiques sur la matrice polymérique. En particulier, on préfère la bétaine, la butyrobétaine, la valérobétaine, la carnitine ou leurs dérivés. Ces produits portent en effet un groupement carboxyle d'un côté de la molécule et une fonction ammonium quaternaire de l'autre côté.

La bétaine et ses dérivés sont des composés naturels, connus pour leur biodégradabilité et leur non toxicité. La bétaine (ou glycine bétaine) est le produit d'oxydation enzymatique de la choline et la butyrobétaine se trouve aussi abondamment dans la nature, comme produit de déshydroxylation de la carnitine. La valérobétaine est présente dans certaines algues et peut être obtenue facilement par voie synthétique.

La formule générale de ligands utilisables dans la présente invention est la suivante :

$\text{OOC} - \text{Y} - \text{N}(\text{CH}_3)_3^+$  formule générale (1)

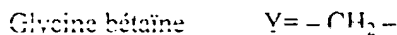
ou, pour la forme saline :



où Y est une chaîne aliphatique de 1 à 16 carbones, saturée ou non, ramifiée ou non, substituée ou non ,

X<sup>-</sup> est un contre-ion (anion) quelconque, de préférence Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> ou F<sup>-</sup>.

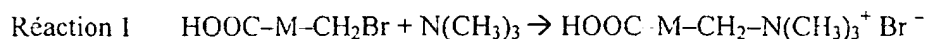
Les différents membres de la famille des bétaines se distinguent par le groupement Y. Les plus communs sont :



Butyrobétaïne	$Y = -(\text{CH}_2)_3 -$
Valérobétaïne	$Y = -(\text{CH}_2)_4 -$
Carnitine	$Y = -\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2 -$

D'autres bétaines naturelles sont connues comme la proline bétaine par

5 exemple, mais celle-ci est considérée comme un alcaloïde, ce qui peut limiter son utilisation. D'autres, non naturelles, à chaîne linéaire plus longue peuvent être facilement obtenues par quaternarisation de la triméthyl amine avec des carboxy alkyl bromures ou chlorures, un exemple étant donné par la réaction 1.



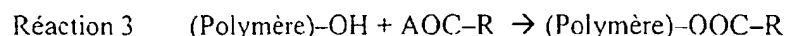
10 (dans laquelle  $\text{M}-\text{CH}_2$  est équivalent au  $Y$  décrit précédemment excepté dans le cas de la glycine bétaine où  $M$  est inexistant, car  $Y = -\text{CH}_2-$ ).

Leur activation afin de pouvoir estérifier un groupement hydroxyle présent dans un polymère est aussi aisément réalisée par les techniques d'activation des fonctions carboxylate connues de l'homme de métier (préparation d'halogénures d'acide, d'anhydrides ou d'esters activés), notamment la préparation de chlorures d'acide à l'aide du chlorure d'oxalyle (ou chlorure de thionyle), comme cela est exemplifié par la réaction 2.



(où  $R$  correspond à l'ensemble  $-\text{Y}-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{X}^-$  décrit dans la formule 1).

20 Une fois l'halogénure d'acide, l'anhydride ou l'ester activé obtenu, le greffage de ce composé sur un groupement hydroxyle relève de la chimie classique et connue de l'homme du métier dans le cadre des méthodes d'estérification d'alcools, résumée dans la réaction 3.



25 où  $R = -\text{Y}-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{X}^-$  défini dans la formule générale (1)

$A = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, -\text{O}-\text{CO}-\text{R}$ , ester activé.

Les dérivés de la bétaine n'avaient jamais été utilisés précédemment pour cationiser un polymère par une liaison ester, précisément parce que l'on sait que la liaison ester qui se forme avec le polysaccharide est déstabilisée par l'effet électroattracteur du groupement triméthylammonium de la bétaine sur la liaison ester, en fonction des conditions de pH et/ou de température.

Ainsi, par exemple, la fonctionnalisation d'un polymère polyhydroxylé avec de la glycine bétaine produit un polymère cationique dont la charge cationique est

stable à pH acide (pH 4-5) mais celui-ci s'hydrolyse spontanément et ceci d'autant plus vite que le pH est plus élevé. La durée de vie de cet ester en conditions physiologiques (pH 7,4 ; 37°C) est à peine de quelques heures.

La Demanderesse a montré que le fait d'éloigner la fonction ammonium quaternaire de la liaison ester augmente la stabilité de celle-ci de façon très forte. Ainsi, un polymère polyhydroxylé estérifié avec de la butyrobétaine a une durée de vie de quelques jours en conditions physiologiques et un polymère dérivé par la valérobétaine a une durée de vie de quelques semaines.

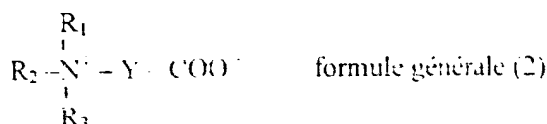
C'est l'un des intérêts de la présente invention que d'obtenir des polymères ou matrices cationiques pouvant être déstabilisés et s'hydrolyser dans certaines conditions, et dont les caractéristiques de dégradation peuvent être contrôlées en choisissant le type de ligand que l'on greffe pour obtenir un polymère selon l'invention.

Des polymères plus stables peuvent être obtenus en utilisant des bétaines synthétiques possédant des chaînes Y plus longues, des chaînes Y ramifiées ou des chaînes Y possédant des groupements intermédiaires susceptibles de moduler l'effet électroattracteur de la fonction ammonium quaternaire. Tous les polymères ainsi obtenus sont stables à des pH plus faibles (normalement pH 4-6) et pour les plus instables la conservation à basse température ou à l'état sec est souhaitable.

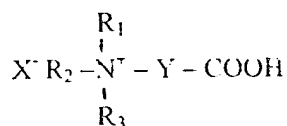
La Demanderesse a simplifié la notion de déstabilisation de la fonction ester par « effet électroattracteur », sachant que la réalité est probablement plus complexe. La modification de la réactivité de la fonction carboxylate dans le cas décrit dans la présente invention est plus probablement le résultat d'un ensemble d'effets et notamment d'un effet électroattracteur, d'un effet de « champ » dû à la proximité de la fonction cationique et d'un effet stérique principalement dû au type de substituants présentés dans la fonction aminée.

Ainsi, d'autres amines d'ordre inférieur (amines tertiaires, secondaires ou primaires) présentent également un pouvoir électroattracteur qui, bien que moins fort que pour les ammoniums quaternaires, peut être suffisant pour permettre la modulation de la stabilité d'un ester adjacent. Ainsi, les composés pouvant servir à une mise en œuvre de l'invention répondent à une formule générale pouvant être exprimée de la façon suivante :





5 ou, pour sa forme saline :



10 où X<sup>-</sup> et Y ont la même définition que dans la formule (1) et R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, identiques ou différents sont choisis parmi H et CH<sub>3</sub>.

Il est clair que, en fonction de la voie d'administration du polymère, les pH et températures auxquels il va être confronté sont variables, d'où l'intérêt d'avoir une famille de composés permettant de moduler cette dégradation.

15 On peut envisager par exemple l'utilisation de ces polymères, ou de matrices construites à partir de ces polymères, pour une application de relargage de composés par voie orale. Les polymères seront stables dans l'estomac à pH acide, puis commenceront à perdre leur charge en fonction de la montée du pH intestinal. On peut donc essayer de cibler une zone de relargage préférentielle.

20 Ainsi, le choix du dérivé du ligand de formule (1) ou (2) que l'on utilise pour le greffage de ligands cationiques sur le polymère est effectué en fonction de l'utilisation désirée. La vitesse de dégradation de ces polymères peut être modulée de façon plus fine en utilisant des mélanges de greffons cationiques tels que précédemment décrits.

25 C'est donc un avantage de la présente invention que de permettre une certaine adaptation des qualités requises de dégradabilité de la liaison polymère – ligand cationique en fonction de la longueur de la chaîne utilisée et/ou de la nature de cette chaîne et de substituants éventuels. Cette facilité d'adaptation, sans changer les procédés de synthèse du polymère selon l'invention permet de pouvoir utiliser toutes sortes de principes actifs différents, possédant des propriétés variées, pour  
30 des applications et des modes d'administrations divers.

Les polymères selon l'invention peuvent être de toute sorte, à condition qu'ils soient polyhydroxylés, c'est-à-dire qu'ils possèdent des fonctions hydroxyle libres, c'est à dire accessibles pour l'estérification. Ces polymères peuvent être

naturels ou synthétiques, linéaires ou ramifiés. Ils peuvent être des copolymères, ou être préalablement modifiés ou hydrolysés. De manière préférée, on utilise des polysaccharides ou des oligosaccharides, linéaires ou ramifiés, réticulés ou non. On peut également utiliser l'alcool polyvinylique. Les polysaccharides sont choisis de préférence parmi le dextrane, l'amylose et l'amylopectine ou un mélange des deux, des hydrolysats d'amidon, des maltodextrines, la cellulose, le polymannose, le polygalactose ou leurs dérivés.

Le degré de fonctionnalisation (nombre de greffage de charges) du polymère peut être très variable en fonction des applications envisagées, l'invention concernant les polymères cationiques quel que soit leur taux de charge. Ainsi, le taux de charge peut être très variable, de préférence entre 0,1 et 4 mmol de fonctions ammonium quaternaire par gramme de polymère.

L'invention concerne aussi des matrices polymériques ou constructions macromoléculaires qui peuvent être obtenues par réticulation ou copolymérisation des polymères cationiques selon l'invention.

En effet, les polymères obtenus selon l'invention peuvent être réticulés, naturellement ou chimiquement. L'homme de métier connaît les procédés de réticulation et pourra, en particulier, utiliser l'épichlorhydrine, l'oxychlorure de phosphore, le trimétaphosphate, les bis époxydes, les acides dicarboxyliques.

Dans un autre aspect de l'invention et pour des raisons de compatibilité chimique ou de simplicité du procédé, les polymères polyhydroxylés initiaux pourront être réticulés ou copolymérisés au préalable, l'introduction des fonctions bétaine intervenant dans une étape ultérieure et directement sur la matrice polymérique obtenue.

Une telle matrice polymérique peut prendre des formes diverses, en particulier, par exemple : particules visibles, microparticules, nanoparticules, films, patches, etc.... Quelle que soit la forme que l'on désire donner à la matrice polymérique selon l'invention, il est à noter que l'on peut effectuer le greffage des fonctions ammonium quaternaire à l'intérieur de la matrice après que la forme a été déterminée. On peut aussi préparer des matrices polymériques selon l'invention et les modeler ultérieurement.

Il est évident que toutes les propriétés de dégradation des polymères cationiques explicitées précédemment sont également valables pour les matrices polymériques cationiques.

Les polymères cationiques selon l'invention possèdent donc des propriétés  
5 intéressantes, en particulier pour :

- leur pouvoir d'amélioration de la capacité immunogène d'un antigène
- leur pouvoir mucoadhésif ou bioadhésif
- leur capacité à relarguer un actif de façon contrôlée, au niveau topique, mucosal, parentéral, oral ou cellulaire
- 10 - leur capacité à améliorer l'absorption notamment intestinale de certaines molécules.

Ainsi, on peut incorporer un principe actif (une molécule à activité biologique) dans un polymère ou une matrice selon l'invention, afin de pouvoir améliorer la libération de ladite molécule. Cette molécule à activité biologique peut  
15 en particulier être choisie parmi les molécules à activité thérapeutique, à activité cosmétique ou peut être un agent de diagnostic.

Dans un cas particulier, les polymères ou matrices selon l'invention sont complexé(e)s à un principe actif polyanionique, par exemple : héparine, acide nucléique tel que ADN, ARN ou oligonucléotide simple ou double brins, ou leurs  
20 variants (phosphorothioate, acide nucléique peptidique (PNA), méthylphosphonate...).

Cette complexation peut se faire par simple mélange, l'ordre dans lequel les composants sont mélangés étant sans importance. Des étapes complémentaires d'homogénéisation, de lyophilisation, de concentration, d'évaporation ou  
25 d'ultrafiltration peuvent être ajoutées de manière optionnelle. De façon préférée, on le rapport de la charge du polymère sur la charge du principe actif est compris entre 50 % et 2000 %.

Une des caractéristiques de ces formulations est de permettre un relargage contrôlé du polyanion, ledit relargage étant fonction du polymère ou de la matrice choisie), et dépendant du type de greffon, de la charge du polymère, du ratio de charge polymère/charge principe actif et de la masse moléculaire du polymère.  
30

En fonction de ces paramètres, le relargage peut être effectué en quelques heures (cas Gb-betaine), en quelques jours (cas W200-butyrobetaine), voire en

quelques semaines (cas W200-butyrobétaïne à forte charge), ainsi que le montre l'exemple 12.

Les procédés de préparation de polymères selon l'invention, comprenant en particulier les étapes suivantes :

- 5                   a. de façon optionnelle, on synthétise un ligand répondant à la formule générale (2) contenant une fonction carboxylate et une fonction ammonium quaternaire, amine tertiaire ou secondaire ;
- b. on effectue l'activation du groupement carboxylate porté par le ligand cationique ;
- 10               c. on effectue une réaction d'estérification sur les groupements hydroxyles du squelette polyhydroxylé.

font également partie de l'invention. On peut obtenir une matrice selon l'invention lorsque l'on ajoute l'étape :

- d. on réticule ou copolymérise le polymère obtenu en c. afin
- 15               d'obtenir une matrice polymérique.

Pour l'obtention d'une matrice selon l'invention, cette étape peut ne pas s'avérer nécessaire si le squelette polymérique a été réticulé ou copolymérisé préalablement ou bien l'être naturellement.

- De préférence, le ligand utilisé répond à la formule générale (1) et contient
- 20               une fonction carboxylate et une fonction ammonium quaternaire.

L'activation du groupement carboxylate porté par le ligand cationique s'effectue de préférence par action de  $\text{COCl-COCl}$  ou  $\text{SOCl}_2$ .

- L'invention concerne aussi l'utilisation des polymères ou matrices polymériques quelle que soit leur forme pour la formulation, le transport, la
- 25               vectorisation, la protection, l'amélioration de l'efficacité, l'administration ou le relargage de molécules biologiquement actives à usage pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire et ceci quelle que soit la voie d'administration choisie : voie mucoale (nasale, vaginale, rectale, buccale, pulmonaire), voie topique (oculaire, dermatique, optique), voie orale et voie parentérale (intraveineuse, intramusculaire,
- 30               intradermique, sous-cutanée, intraoculaire).

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient un polymère ou une matrice polymérique cationique selon l'invention dans lequel est incorporé un principe actif, et un

support pharmaceutiquement acceptable pour son administration. Les polymères ou matrices selon l'invention sont notamment utiles pour des applications thérapeutiques et en immunologie.

5 L'invention a également pour objet une composition cosmétologique, caractérisée en ce qu'elle contient un polymère ou une matrice polymérique cationique selon l'invention dans lequel est incorporé un principe actif à activité dermatologique et/ou cosmétique, et des excipients cosmétologiquement acceptables.

10 Les compositions alimentaires comprenant des polymères ou des matrices polymériques cationiques selon l'invention font partie de l'invention.

Enfin, les polymères ou matrices polymériques selon l'invention, quelle que soit leur forme, peuvent être utilisés pour la préparation de médicaments, ou de vaccins, ce qui est un objet de l'invention.

15 Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention, en décrivant certains modes de réalisation particuliers, et ne doivent pas être considérés comme limitant le champ de l'invention.

#### BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

20 Figure 1 : hydrolyse de la fonction bétainée dans les polysaccharides fonctionnalisés par la glycine bétaine dans les conditions citées dans l'exemple 4.

Figure 2 : hydrolyse de la fonction bétainée dans des polysaccharides fonctionnalisés par la butyrobétaine (losanges) et la valérobétaine (triangles) dans les conditions citées dans l'exemple 4.

25 Figure 3 : Suivi de l'élimination totale (fécale et urinaire) de différents polymères fonctionnalisés par la valérobétaine, la butyrobétaine ou le GTMA. Les résultats sont exprimés comme l'excrétion cumulée en fonction du temps.

Figure 4 : Suivi de l'élimination urinaire de différents polymères fonctionnalisés par la valérobétaine, la butyrobétaine ou le GTMA. Les résultats sont exprimés comme l'excrétion cumulée en fonction du temps.

30 Figure 5 : Suivi de l'élimination fécale de différents polymères fonctionnalisés par la valérobétaine, la butyrobétaine ou le GTMA. Les résultats sont exprimés comme l'excrétion cumulée en fonction du temps.

Figure 6 : Cinétiques de relargage de l'ADN à pH 7,4 et 37°C à partir des complexes formés par les polymères dérivés par la Glycine bêtaïne.

Figure 7 : Cinétiques de relargage de l'ADN à pH 7,4 et 37°C à partir des complexes formés par les polymères type Glucidex 6 dérivés par la Butyrobétaïne.

5      Figure 8 : Cinétiques de relargage de l'ADN à pH 7,4 et 37°C à partir des complexes formés par les polymères type Waxylis 200 dérivés par la Butyrobétaïne.

## EXEMPLES

### 10      Exemple 1 : Synthèse de la valérobétaïne

Une quantité de 40 g (0,22 mol) d'acide bromovalérique (Fluka, Saint Quentin Fallavier) est solubilisée dans un volume de 250 ml de Dioxane (Prolabo, Paris) sous agitation magnétique.

15      Un volume de 50 ml de Triméthylamine liquide (0,59 mole) est ajouté en maintenant la réaction à 0 °C pendant 30 minutes. La réaction est ensuite laissée 20 heures à température ambiante. Le dioxane et l'excès de triméthyl amine sont éliminés par évaporation au moyen d'une pompe chimique à vide. Le produit obtenu est dissous dans de l'éthanol et recristallisé dans un mélange éthanol : eau (90 : 10 v/v). Le précipité obtenu est filtré et séché sous pression réduite.

20      On obtient de la valérobétaïne sous forme bromhydrate avec un rendement de récupération de 60 % et une pureté, analysée par HPLC et par titrage de la fonction carboxylate, supérieure à 90 %.

L'identification du produit est faite par RMN du proton et du <sup>13</sup>C et on retrouve toutes les bandes caractéristiques du produit attendu.

25

### Exemple 2 : Activation de la glycine bêtaïne, butyrobétaïne et la valérobétaïne

30      Une masse de 25 grammes de glycine bêtaïne (0.163 mol), butyrobétaïne (0.14 mol) (Sigma, USA) ou de valérobétaïne synthétisée selon l'exemple 1, est ajoutée par portions dans un ballon rodé contenant un volume de 65 ml de chlorure d'oxalyle (Fluka) (0,76 mole) sous agitation magnétique. On maintient sous agitation pendant 15 heures puis on chauffe pendant une heure à T = 45 °C.

L'excès de chlorure d'oxalyle est éliminé sous pression réduite et piégé sous vide sur une garde préalablement refroidie à l'azote liquide. La poudre récupérée est

lavé 3 fois avec un volume de 200 ml d'éther de pétrole (SDS, Aucamville, France) puis séchée sous pression réduite. Le chlorure d'acide des dérivés de bétaine est hygroscopique et il est donc récupéré dans une boîte à gants sous atmosphère à humidité contrôlée.

5 La caractérisation se fait par RMN du proton et du  $^{13}\text{C}$ . Le spectre des trois produits correspond parfaitement au produit attendu. Le rendement de chloration est déterminé par comparaison entre le titrage de l'acide carboxylique après hydrolyse ou après éthanolyse. La pureté des chlorures d'acide est aussi confirmée par analyse HPLC des bétaines correspondantes après hydrolyse.

10 Rendement de chloration de la glycinebétaine = 92 %      Pureté = 76 %.  
Rendement de chloration de la butyrobétaine = 100 %      Pureté = 85 %.  
Rendement de chloration de la valerobétaine = 100 %      Pureté = 75 %.

Ces résultats sont conformes à la littérature où les rendements de chloration avec du chlorure d'oxalyle sont typiquement quantitatifs. La pureté du produit  
15 obtenu est due à la formation de sels d'oxalates mixtes avec les fonctions bétainées et la purification reste difficile. Le produit ainsi obtenu reste cependant parfaitement utilisable pour les réactions d'estérification ultérieures.

Exemple 3 : Préparation d'un polymère cationique par greffage de glycine bétaine, butyrobétaine ou valerobétaine sur un squelette polymérique, polyhydroxylé du type polysaccharide (maltodextrine)

20 Une quantité de 10 g de maltodextrine (hydrolysate d'amidon, PM= 8100, Glucidex 2, Roquette Frères, Lestrem, France) est solubilisée dans un volume de 200 ml de diméthylformamide (Fluka, Suisse) contenant 25 ml de pyridine (Fluka,  
25 Suisse). La quantité de chlorure d'acide des différentes bétaines est rajoutée en fonction du taux de charge désiré. Lorsqu'on rajoute une mole de réactif par unité de sucre, on rajoute:

Chlorure d'acide de bétaine: 0,062 mol soit 10,6 g de réactif.

Chlorure d'acide de butyrobétaine: 0,062 mol soit 12,34 g.

30 Chlorure d'acide de valerobétaine: 0,062 mol soit 13,21 g.

La réaction est maintenue sous agitation à température ambiante pendant environ 15 heures. Le polysaccharide (maltodextrine) fonctionnalisé est ensuite dilué avec 500 ml de tampon acétate 0,2 M pH 5.

La diméthylformamide, la pyridine, les sels de pyridinium, la bétaine non greffée et le tampon acétate sont ensuite éliminés par ultrafiltration tangentielle sur une membrane de seuil de coupure 30 Kd (Filtron, France). La solution de polymère fonctionnalisé est dialysée contre de l'eau jusqu'à élimination totale des sels secondaires issus de la réaction. Le pH est alors contrôlé et ramené à 5 avec de l'acide chlorhydrique (Prolabo) si nécessaire.

On obtient une solution de polymère (maltodextrine) fonctionnalisée à une concentration de 25 g/l en polymère.

Le taux de charge de chaque polymère est déterminé par chromatographie HPLC après hydrolyse de la fonction greffée. Les rendements de greffage sont tous d'environ 30 %.

Glucidex2-Bétaine 2      Rendement de greffage = 32 %      Charge = 2 mEq/g.

Glucidex 2-Butyro 1,8      Rendement de greffage = 30 %      Charge = 1,8 mEq/g.

Glucidex 2-Valéro 1,6      Rendement de greffage = 25 %      Charge = 1,6 mEq/g.

Il est évident que pour un même greffon, différents taux de charge peuvent être obtenus en faisant varier simplement la quantité de réactif utilisé.

#### Exemple 4 : Dégradation "in vitro" des polymères

Les trois types de polymères fonctionnalisés obtenus dans l'exemple 3 sont solubilisés à 10 g/l dans du tampon Phosphate pH 7,4 et maintenus à 37 °C. La perte de charge est suivie par analyse HPLC et exprimée sous forme de pourcentage de greffons hydrolysés par rapport au total contenu dans le polymère.

La Figure 1 représente la vitesse d'hydrolyse de la fonction bétainée dans les polysaccharides fonctionnalisés par la glycine bétaine dans les conditions citées.

La Figure 2 représente la vitesse d'hydrolyse de la fonction bétainée dans des polysaccharides fonctionnalisés par la butyrobétaine et la valérobétaine dans les conditions citées.

Comme on pouvait s'y attendre, on constate sur ces deux graphes que plus la chaîne bétaine est longue, plus les polymères cationiques obtenus sont stables.

#### Exemple 5 : Préparation de polymères non-dégradables à base de polysaccharide modifié par le glycidyl triméthyl ammonium



On a obtenu des polymères cationiques à partir de deux polysaccharides différents : une maltodextrine (Glucidex 2, Roquette Frères, France) et de l'amylopectine de maïs (Waxyliis 200, Roquette Frères, France), par application du même protocole.

- 5            50 g de polysaccharide sont dispersés dans 110 ml d'une solution 2M d'hydroxyde de sodium (NaOH, Prolabo, France) dans une réacteur en verre muni d'une pale d'agitation mécanique. Une fois la solubilisation complète du polysaccharide obtenue on ajoute 31 g (0,2 mol) de glycidyl triméthyl ammonium (GTMA, Fluka, Suisse) et la réaction est laissée à température ambiante pendant 8  
10 heures.

- On neutralise avec de l'acide acétique, on amène à un volume de 1,5 litres avec de l'eau osmosée et on diafiltre contre de l'eau osmosée. La diafiltration est réalisée dans un système d'ultrafiltration Minisette (Pall-Filtron, France) équipé d'une membrane d'ultrafiltration de point de coupure 30 kD. Une fois la  
15 conductivité du filtrat inférieure à 20  $\mu$ Siemens, la suspension de polysaccharide modifié est concentrée et filtrée sur une membrane 0,45  $\mu$ m (Gelman, France).

Les deux suspensions de polysaccharide modifié sont caractérisées par leur concentration et la teneur en ammonium quaternaire par analyse élémentaire d'azote.

- 20            Glucidex 2 – GTMA 1,8  
                 Concentration : 25 g/l  
                 Taux de fonctionnalisation : 1,8 mEq d'ammonium quaternaire par  
                 gramme de polymère.  
                 Waxyliis 200-GTMA 2  
25            Concentration : 15 g/l  
                 Taux de fonctionnalisation : 2 mEq d'ammonium quaternaire par  
                 gramme de polymère.

Dans ce cas, les fonctions ammonium quaternaire sont greffées sur le polysaccharide par une liaison éther très stable.

30

Exemple 6 : Toxicité aiguë des polymères bétainés comparés à leurs homologues non bioéliminables

*Protocole* : des souris Crl CD-1(ICR)BR (Centre d'élevage Charles RIVER, 76 410 Saint-Aubin- lès-Elbeuf) (50 mâles et 50 femelles) ont été partagées en groupes de 10 souris (5 mâles et 5 femelles). On a administré par voie intraveineuse à différentes doses les polymères obtenus dans les exemples 3 et 5 avec un témoin de

5 maltodextrine non modifiée (polymère neutre) :

Glucidex 2-Butyro 1,8

Glucidex 2-Valéro 1,6

Polymère neutre (Glucidex 2)

Glucidex 2-GTMA 1,8

10 Un groupe contrôle de 10 souris (5 mâles et 5 femelles) a reçu une administration intraveineuse du véhicule dans les mêmes conditions.

Après administration l'étude a porté sur:

- des examens cliniques et un suivi de la mortalité
  - un suivi du poids pondéral avec une pesée des animaux la veille
- 15 de l'essai soit à j-1 ainsi qu'aux jours +1, +4, +6, +11, +14.

Tous les animaux mourant en cours d'étude ont été autopsiés dans les meilleurs délais et leurs principaux organes (foie, rate, rein, estomac, intestin, poumons, cocur) ont été observés macroscopiquement. Tous les animaux survivants à la fin de la période d'observation de 14 jours ont été sacrifiés et autopsiés et les

20 principaux organes (comme cités précédemment) ont été observés macroscopiquement

*Résultats* : pour le polymère fonctionnalisé par le GTMA (Glucidex 2-GTMA 1,8), la mortalité est de 20 % et 50 % aux doses respectives de 20 et 25 mg/kg. La dose maximale non létale pour ce produit est égale à 18 mg/kg après administration

25 intraveineuse chez la souris. A cette dose, aucun signe clinique n'a pu être observé.

Pour le polymère neutre, la dose maximale non létale est égale ou supérieure à 100 mg/kg après administration intraveineuse chez la souris. A cette dose, aucun signe clinique n'a pu être observé.

Pour le Glucidex 2 Butyro 1,8 une mortalité de 40% est observée à la dose

30 de 74,5 mg/kg. Aucune mortalité n'ayant été observée à la dose de 37,25 mg/kg, la dose maximale non létale du Glucidex 2 cationique fonctionnalisé Butyrobétaïne semble être égale à 37,25 mg/kg après administration intraveineuse chez la souris. A cette dose, aucun signe clinique n'a pu être observé.

Pour le produit Glucidex 2-Valéro 1,6 administré à la dose de 30 mg/kg i.v., une mortalité de 50 % a été observée dès le premier jour de l'étude. A la dose de 20 mg/kg, aucune mortalité n'a été observée. Ainsi, pour le Glucidex 2 cationique fonctionnalisé Valérobétaïne la dose maximale non létale est égale à 20 mg/kg après  
5 administration intraveineuse chez la souris. A cette dose, aucun signe clinique n'a pu être observé.

Parallèlement le suivi du poids corporel des animaux ne montre aucune modification de la courbe de poids attribuable à l'administration des produits testés.

Les résultats montrent que la toxicité aiguë des polymères cationiques est  
10 fortement influencée par la nature du greffon utilisé. Ainsi le polymère greffé par la butyrobétaïne qui est fortement et rapidement bioéliminable présente la plus faible toxicité aiguë chez la souris avec une DL50 d'environ 75 mg/kg. A l'inverse le polymère fonctionnalisé par le GTMA et très faiblement bioéliminable présente la toxicité aiguë la plus sévère avec une DL50 de 25 mg/kg chez la souris.

15

Exemple 7 : Préparation d'un polymère cationique par greffage de la butyrobétaïne sur un squelette polymérique non polysaccharidique (alcool polyvinylique)

Cet exemple montre la possibilité de réaliser la réaction d'estérification en milieu aqueux, et non pas seulement en milieu diméthyl formamide. Les  
20 rendements peuvent être sensiblement améliorés par l'étude des conditions de pH, température et concentration.

20 g d'alcool polyvinylique ( Mw : 22000, Fluka, Suisse) sont placés dans un réacteur en verre à double enveloppe connecté à un groupe thermostatique et dispersés avec 100 ml d'eau osmosée puis portés à 80°C pendant 2 heures pour  
25 obtenir une solution visqueuse d'alcool polyvinylique qui est ensuite refroidie à température ambiante. On ajoute alors 10 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,5 et on maintient le mélange sous agitation mécanique, on refroidit le mélange à 4 °C.

Le réacteur est ensuite équipé d'une électrode pH connectée à un contrôleur de pH contenant de l'hydroxyde de sodium 2M. La consigne du contrôleur de pH  
30 est fixée à pH 7.5.

On ajoute alors de façon progressive 10 g de chlorure d'acide de butyrobétaïne (exemple 2). Le pH est maintenu à 7,5 et la température à 4°C pendant la réaction.

A la fin de l'addition du réactif la réaction est laissée 30 minutes à 4 °C puis diluée avec 200 ml de tampon acétate 0,2 M pH 5. On diafiltre contre de l'eau osmosée dans un système d'ultrafiltration Minisette (Pall-Filtron) équipé d'une membrane de point de coupure 10 kD.

- 5 On récupère une solution aqueuse d'alcool polyvinylique modifié par des groupements ester de butyrobétaïne à 25 g/l . Le taux d'estérification mesuré par analyse d'azote élémentaire est de 0,3 mEq/g. Ceci implique un rendement de réaction en milieu aqueux de 15 %.

10 Exemple 8 : Préparation d'une matrice nanoparticulaire réticulée par l'épichlorhydrine et greffée avec de la valérobétaïne

- Une quantité de 100 g de polysaccharide (Glucidex 6, Roquette Frères) est dispersée dans 160 ml d'eau. Lorsque la suspension est homogène un volume de 40 ml de soude 10M est ajouté. La solution alcaline de polysaccharide est maintenue
- 15 sous agitation jusqu'à l'obtention d'une solution translucide. Une quantité de 8,15 g (soit 88,2 mmol) d'épichlorhydrine (Sigma, USA) est alors ajoutée. On laisse pendant une nuit sous agitation douce. On observe une gélification du polysaccharide. Un volume d'environ 2 litres d'eau est ajouté et le pH est ajusté entre 5 et 6 avec de l'acide acétique. Cette suspension est pré-homogénéisée avec un
- 20 Ultra-Turrax modèle T-25 (IKA, Bioblock) puis homogénéisée à une pression de 900 bars à l'aide d'un homogénéisateur Minilab H-80 (Rannie, Danemark) afin d'obtenir des nanoparticules de 50 à 100 nm (analyseur submicronique Coulter N4SD, Coultronics, USA).

- Ces nanoparticules sont ensuite purifiées par ultrafiltration sur une
- 25 membrane de 30kD (système d'ultrafiltration Minisette, Filtron, Pall Gelman Sciences, USA). La suspension de particules est ensuite purifiée par micro-filtration sur une membrane 0,2 µm (Spiral-Cap, Pall Gelman Sciences, USA) et les particules sont séchées par lyophilisation.

- Une quantité de 5 g de particules polysaccharidiques obtenues
- 30 précédemment est dispersée dans un volume de 200 ml de diméthylformamide contenant 25 ml de pyridine. Une quantité de 5,5 g (27 mmol) de chlorure d'acide de valérobétaïne (obtenu selon l'exemple 7) est ajoutée. La réaction est laissée sous agitation pendant une nuit. La suspension de nanoparticules dérivées est diluée avec

500 ml de tampon acétate 0,2 M pH 5,5 puis lavée par ultrafiltration sur une membrane de 30 kD (Filtron, France) en réalisant une diafiltration contre de l'eau osmosée. Lorsque la conductivité du filtrat est inférieure à 30  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , le produit est récupéré après concentration. Le pH est contrôlé et ajusté entre 4 et 6 avec de l'acide chlorhydrique.

On obtient une suspension aqueuse de nanoparticules ayant les caractéristiques suivantes :

Concentration (Poids sec) = 26 g/l

Taille des nanoparticules (Coulter N4SD) = 110 nm.

Potentiel Z (Malvern série 3000, Tampon Phosphate 15 mM, pH7): +20 mV

Taux de charge (HPLC) = 2,5 mEq fonction bétaine / g de particules

Des particules de tailles différentes peuvent être obtenues de la même façon en utilisant des taux d'épichlorhydrine différents ou des pressions de broyage différentes.

#### Exemple 9 : Préparation d'une matrice réticulée par l'oxychlorure de phosphore et greffée avec de la valérobétaine

Une quantité de 50 g de maltodextrine PM : 3400 (Glucidex 6, Roquette Frères, France) est dispersée dans 225 ml d'eau. Lorsque la suspension est homogène, on ajoute 25 ml de soude 10M. Après solubilisation totale, la solution est portée à une température comprise entre 0 et 4°C à l'aide d'un groupe froid (Neslab RTE300, Newington, USA). L'ajout de l'agent réticulant (oxychlorure de phosphore  $\text{POCl}_3$ , Sigma, USA) se fait à l'aide d'une pompe dosimétrique (pompe Dosimat DL25, Mettler Toledo, Suisse) à une vitesse de 0,1 ml/min.  $\text{POCl}_3$  est rajouté dans des proportions de 0,5 mEq/g soit 0,025 mol (3,83 g). Lorsque tout le réactif est ajouté, on maintient encore l'agitation pendant 1 heure. Un volume de 500 ml d'eau est ajouté ainsi qu'un volume de 20 ml d'acide acétique afin d'ajuster le pH entre 4 et 5. Le gel est pré-homogénéisé à l'aide de l'Ultra-Turrax IKA modèle I-25 puis homogénéisé à une pression de 900 bars à l'aide d'un homogénéisateur Minilab H-80 (Rannie) afin d'obtenir des nanoparticules de 50 à 100 nm. La suspension est ensuite diafiltrée contre 2 litres d'une solution 0.1 M de chlorure de tétraméthylammonium puis contre de l'eau osmosée (4 litres) puis microfiltrée sur

une membrane de 0,45  $\mu\text{m}$  (SuporCap de 0,45  $\mu\text{m}$ , Pall Gelman Sciences). La suspension de particules ainsi obtenue est ensuite séchée par lyophilisation.

Les caractéristiques des nanoparticules sont:

Taille (Coulter N4SD): 60 nm

5 Taux de phosphore (analyse de phosphore total) = 0,4 mEq / g

Taux de réticulation (titrage acide-base) = 0,2 mEq/g

Une quantité de 8,36 g des particules obtenues est dispersée dans un volume de 210 ml de diméthylformamide contenant 25 ml de pyridine. 5,4 g (soit 25,8 mmol) de chlorure d'acide de valérobétaïne (synthèse exemple 2) sont ajoutés. On  
10 laisse sous agitation pendant une nuit. La suspension de nanoparticules dérivées est diluée dans 500 ml de tampon acétate 0,2 M pH 5,5.

La suspension est ensuite lavée par ultrafiltration sur une membrane de 30 kD (système d'ultra filtration Minisette, Filtron, Pall Gelman) contre de l'eau osmosée puis concentrée avant récupération. Le pH est contrôlé et ajusté entre 4 et  
15 6 avec de l'acide chlorhydrique. Les nanoparticules sont purifiées par micro filtration sur une membrane de 0,2  $\mu\text{m}$  (Spiral-Cap 0,2  $\mu\text{m}$ , Pall Gelman Sciences).

Concentration (poids sec) = 13 g/l

Taille des nanoparticules (Coulter N4SD) = 120 nm.

Taux de fonction bêtaïne (HPLC) = 0,9 mEq/g

20

Exemple 10 : Préparation d'un polymère cationique par greffage de la butyrobétaïne sur un squelette polymérique ramifié à haut poids moléculaire (amylopectine)

Une quantité de 10 g d'amylopectine (Waxyli 200, Roquette Frères, Lestrem, France) est dispersée dans un volume de 200 ml de diméthylformamide  
25 (Fluka, Suisse) contenant 25 ml de pyridine (Fluka, Suisse). On ajoute le chlorure d'acide de la butyrobétaïne préparé selon l'exemple 2 ( 62 mmol, 12,34 g)

On maintient sous agitation à température ambiante pendant environ 15 heures. Le polysaccharide fonctionnalisé est ensuite dilué avec 500 ml de tampon acétate 0,2 M pH 5,5.

30 La diméthylformamide, la pyridine, les sels de pyridinium, la bêtaïne non greffée et le tampon acétate sont ensuite éliminés par ultrafiltration tangentielle sur une membrane de seuil de coupure 30 kD (Filtron, France). La solution de polymère fonctionnalisé est dialysée contre de l'eau jusqu'à la totale élimination des sels

secondaires issus de la réaction. Le pH est alors contrôlé et ramené à 5 avec de l'acide chlorhydrique (Prolabo) si nécessaire.

On obtient une solution de polymère (amylopectine) de haut poids molaire fonctionnalisé, à une concentration de 15 g/l en polymère. Le degré de fonctionnalisation du polymère est déterminé par HPLC du greffon butyrobétaïne après hydrolyse alcaline et est estimé à 2,2 mEq/g

Exemple 11 : Bioélimination comparée des polymères fonctionnalisés par des bétaines ou par du GTMA

10 *Protocole* : on administre par voie intraveineuse à la dose de 5 mg/kg des produits suivants marqués de façon covalente au carbone 14 à des rats Sprague-Dawleys (Centre d'élevage Charles RIVER 76 410 Saint-Aubin- lès-Elbeuf) :

- Glucidex 2-Butyro 1,8
- Glucidex 2-Valéro 1,6
- 15 Glucidex 2-GTMA 1,8
- Waxyliis 200-GTMA 2
- Waxyliis 200 non modifié

Pour chaque animal et de façon individuelle les urines et les fèces sont collectées durant les 14 jours qui suivent l'administration. A la fin de l'étude les animaux sont sacrifiés et différents organes (notamment le foie et la rate) sont collectés. L'ensemble des échantillons, après traitement, est analysé par scintillation liquide.

*Résultats*

Les figures 3 à 5 résument les résultats obtenus en terme d'élimination urinaire et fécale après administration intraveineuse des différents polymères. Ces résultats montrent la forte élimination notamment urinaire des polymères fonctionnalisés par la valérobétaïne et la butyrobétaïne par comparaison aux polymères fonctionnalisés par le GTMA. En effet, ces derniers polymères sont faiblement bioéliminables et 14 jours après administration près de 60 % du produit est toujours présent dans la carcasse des animaux.

Il a été possible de vérifier que la forte rétention des produits fonctionnalisés par le GTMA est liée à une forte captation hépato-splénique et à une non métabolisation de ces produits dans ces organes.

On peut noter que les deux polymères dégradables montrent une bioélimination équivalente à celle du polysaccharide (Waxylis 200) non modifié. La comparaison des polymères fonctionnalisés par la valérobétaïne ou la butyrobétaïne montre que la vitesse d'élimination des produits semble fortement influencée par la nature du greffon. En effet le polymère butyrobétaïne est plus rapidement éliminé par voie urinaire que son homologue valérobétaïne.

L'élimination fécale des polymères peut s'interpréter comme une captation hépatique suivie d'une métabolisation dans cet organe de ce type de polymère. Dans cette hypothèse la différence d'élimination des deux polymères semble confirmer la différence de cinétique de dégradation de ceux-ci. En effet, pour les polymères fonctionnalisés par la valérobétaïne, plus lentement métabolisés dans l'espace plasmatique, une fraction plus importante est certainement captée par le foie pour y être métabolisée.

Ainsi, il est possible de modifier la cinétique de dégradation *in vivo* de polymères cationiques fonctionnalisés par des greffons bétaines en adaptant la nature de la chaîne aliphatique du greffon à la stratégie envisagée.

Exemple 12. Formation de complexes particulières entre les polymères cationiques bétainés et le DNA et cinétiques de relargage *in vitro*

Différents types de polymères cationiques dérivés par la glycine bétaine ou la butyrobétaïne sont préparés selon l'exemple 3, en utilisant deux types de polysaccharides, le Glucidex 6 (maltodextrin, Roquette Frères, masse molaire approx. 3400 Kd) et du Waxylis 200 (Amylopectine, Roquette Frères, Masse Molaire 1-100 Md). Les caractéristiques de chaque polymère préparé sont décrites dans le Tableau 1.

*Tableau 1 : Caractéristiques des différents polymères cationiques préparés.*

Nom	Polysaccharide	Masse Molaire	Greffon	Charge (mEq/g)
G6Bet(2)	Glucidex 6	3400 Kd	Glycine Bétaine	2
W200Bet(1,2)	Waxylis 200	1-100 Md	Glycine Bétaine	1,2
G6Bubet(0,43)	Glucidex 6	3400 Kd	Butyrobétaïne	0.43



G6Bubet(1,65)	Glucidex 6	3400 Kd	Butyrobétaïne	1,65
W200Bubet(0,7)	Waxylis 200	1-100 Md	Butyrobétaïne	0,7
W200Bubet(2,3)	Waxylis 200	1-100 Md	Butyrobétaïne	2,3

100 µg d'un plasmide modèle (pPBShAAThFIX) possédant 6600 paires de bases est dissous dans 100 µl d'eau dans un tube eppendorf. On ajoute la quantité nécessaire de polymère pour neutraliser la moitié (50 %) ou deux fois (200 %) la charge du DNA par les fonctions cationiques. L'opération est réalisée sous agitation (Vortex). Le volume de la formulation est ensuite ajusté à 1 ml par addition de 100 µl de tampon acétate 200 mM, pH 5.3 et de l'eau osmosée en q.s.p pour 1 ml.

On observe la formation de complexes particuliers qui sont analysés par dispersion de lumière (Coulter N4D, Coultronics). Le taux de complexation du DNA est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 %. Les caractéristiques de échantillons obtenues sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Echantillons préparés par complexation du DNA (100 µg) avec les différents polymères du Tableau 1.

Echantillon	Polymère	Rapport de charge Polymère / DNA	DNA Libre	Taille (nm)
G6 Bet (2) 50%	G6Bet (2)	50 %	15 %	300-500
G6Bet (2) 200%	G6Bet (2)	200 %	0 %	250-400
W200Bet (1,2) 50%	W200bet (1,2)	50 %	14 %	500-2000
W200bet (1,2) 200%	W200 (1,2)	200 %	0 %	300-700
G6Bubet (0,43) 50%	G6Bubet (0,43)	50 %	47 %	280-400
G6Bubet (0,43)200%	G6Bubet (0,43)	200 %	0 %	150-300
G6Bubet (1,65) 50%	G6Bubet (1,65)	50 %	8 %	300-400
G6Bubet (1,65) 200%	G6Bubet (1,65)	200 %	0 %	250-350
W200Bubet (0,7) 50%	W200Bubet (0,7)	50 %	0 %	1000-2000
W200Bubet (0,7)200%	W200Bubet (0,7)	200 %	0 %	300-500
W200Bubet (2,3) 50%	W200Bubet (2,3)	50 %	13 %	1000-2000
W200Bubet (2,3) 200%	W200Bubet(2,3)	200 %	0 %	300-700

Le taux du DNA libre est déterminé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % . Les mesures de taille sont réalisées sur Coulter N4D, Coultronics.

Pour les études de relargage, 900µl de formulations sont additionnés de  
5 100µl de tampon phosphate 1 M pH 7,4 et placées à 37°C. Des échantillons sont  
prélevés à différents temps et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 %  
afin de déterminer la fraction du DNA libéré.

La Figure 6 présente les résultats de relargage obtenus avec les polymères de  
différentes masses molaires et charges dérivés par la bétaine. On observe clairement  
10 une libération du DNA avec des cinétiques variables en fonction du ration de charge  
polymère/DNA et de la masse molaire du polymère. Toutes les cinétiques sont  
néanmoins finies dans quelques heures, indiquant une influence prédominante de la  
vitesse d'hydrolyse du greffon glycine bétaine.

La Figure 7 présente les résultats obtenus avec les polymères type Glucidex  
15 6 dérivés par la butyrobétaine et la Figure 8 ceux obtenus avec les polymères type  
Waxylis 200 dérivés par la butyrobétaine. Dans ce cas les cinétiques de relargage  
sont plus longues (jours) indiquant à nouveau un effet prédominant de la vitesse  
d'hydrolyse du greffon. Dans un degré moindre, les cinétiques dépendent aussi de la  
charge et masse molaire du polymère ainsi que du ratio de charge entre les  
20 polymères et le DNA.

## REVENDEICATIONS

1. Polymère cationique caractérisé en ce qu'il consiste en un squelette polymérique polyhydroxyle sur lequel sont greffés des ligands cationiques par des liaisons hydrolysables en milieu physiologique, dont la vitesse de dégradation est contrôlée par la structure du ligand cationique utilisé.
2. Polymère cationique selon la revendication 1, caractérisé en ce que la liaison (squelette polymérique) – (ligand cationique) est une liaison ester sur les groupements hydroxyles dudit squelette polymérique.
3. Polymère cationique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les ligands cationiques répondent à la formule générale (2) ou sa forme saline :



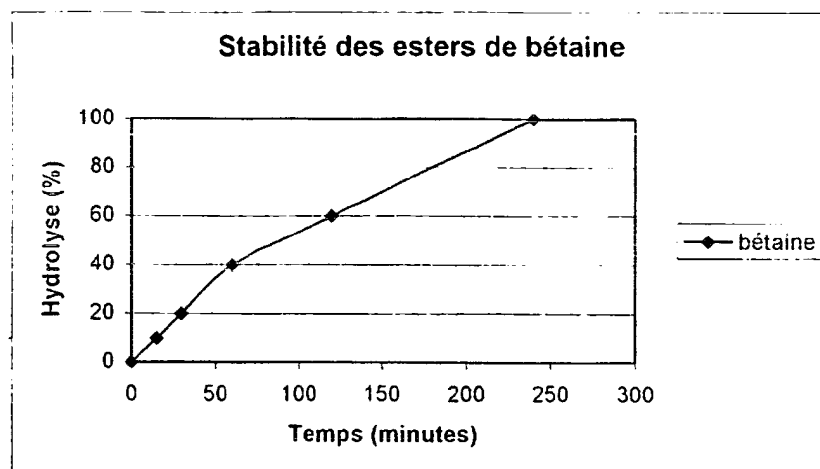
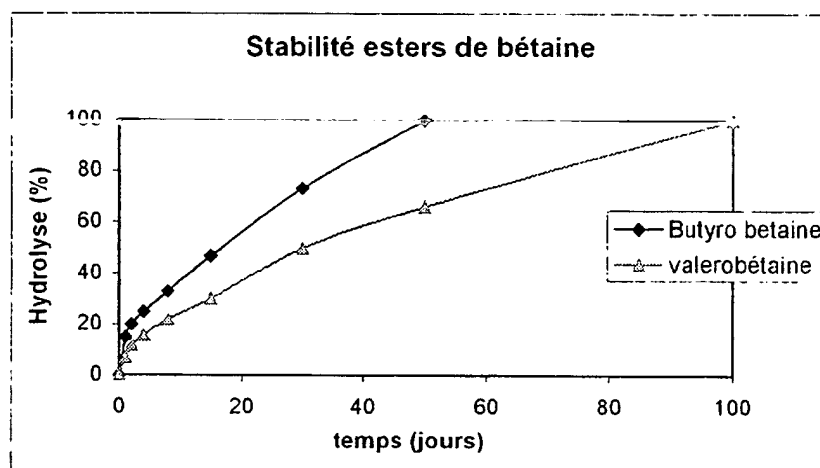
- où Y est une chaîne aliphatique de 1 à 16 carbones, saturée ou non, ramifiée ou non, substituée ou non ;

$R_1, R_2, R_3$ , identiques ou différents sont choisis parmi  $-H$  et  $-CH_3$ .

4. Matrice polymérique caractérisée en ce qu'elle est obtenue par réticulation ou copolymérisation du polymère cationique selon l'une des revendications 1 à 3.
5. Matrice polymérique cationique caractérisée en ce qu'elle est obtenue par greffage de ligands cationiques de formule générale (2) sur un squelette polymérique polyhydroxylé préalablement réticulé ou copolymérisé.
6. Procédé de préparation d'un polymère cationique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
  - a. de façon optionnelle, on synthétise un ligand répondant à la formule générale (2) contenant une fonction carboxylate et une fonction ammonium quaternaire, amine tertiaire ou secondaire ;
  - b. on effectue l'activation du groupement carboxylate porté par le ligand cationique ;
  - c. on effectue une réaction d'estérification sur les groupements hydroxyles du squelette polyhydroxylé.
7. Procédé de préparation d'une matrice polymérique cationique selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5
- a. de façon optionnelle, on synthétise un ligand répondant à la formule générale (2) contenant une fonction carboxylate et une fonction ammonium quaternaire, amine tertiaire ou secondaire ;
  - b. on effectue l'activation du groupement carboxylate porté par le ligand cationique ;
  - c. on effectue une réaction d'estérification sur les groupements hydroxyles du squelette polyhydroxylé qui peut avoir été préalablement réticulé ou copolymérisé ;
  - d. si nécessaire, on réticule ou copolymérise le polymère obtenu en
- 10 c. afin d'obtenir une matrice polymérique.
8. Utilisation d'un polymère selon l'une des revendications 1 à 3 ou obtenu par un procédé selon la revendication 6 ou d'une matrice selon l'une des revendications 4 ou 5 ou obtenue par un procédé selon la revendication 7 pour la fabrication d'une composition caractérisée en ce qu'il s'agit d'un complexe
- 15 (polymère ou matrice) – (principe actif), ledit polymère ou ladite matrice assurant le relargage contrôlé dudit principe actif.
9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit principe actif est un principe actif polyanionique.
10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit principe actif est
- 20 choisi dans le groupe constitué de l'ADN, l'ARN, les oligonucléotides simple ou double brins, leurs variants et un mélange de ces produits.

1/5

FIG.1FIG.2

2/5

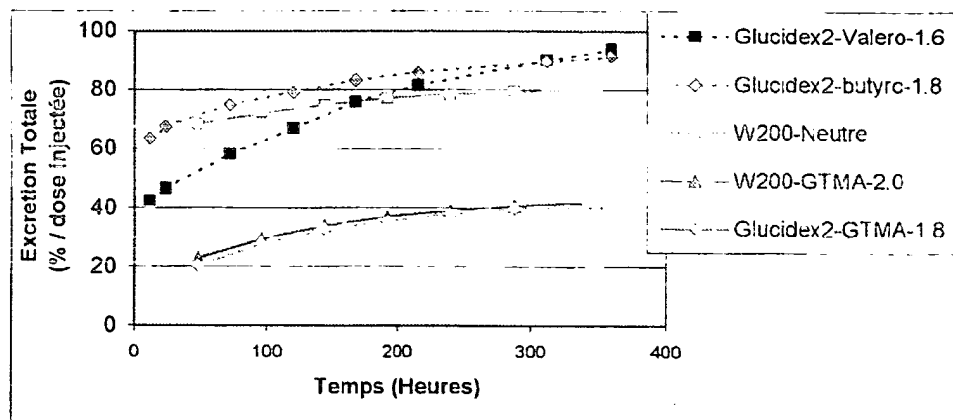


FIG. 3

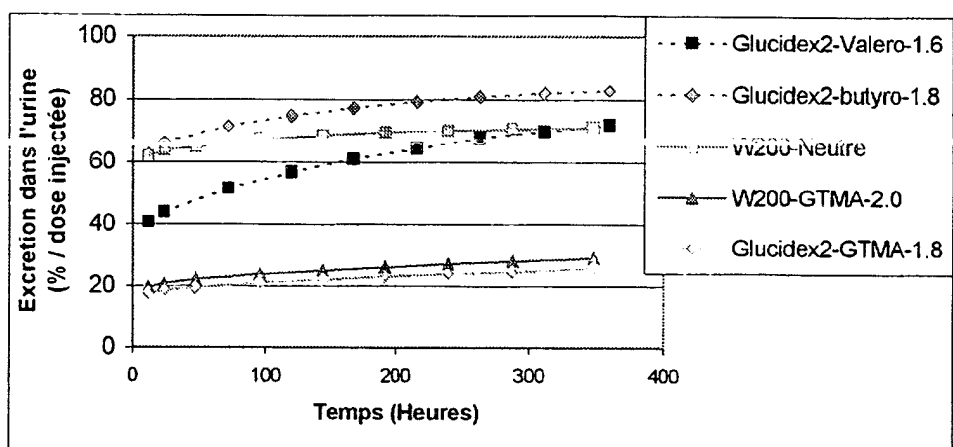


FIG.4

3/5

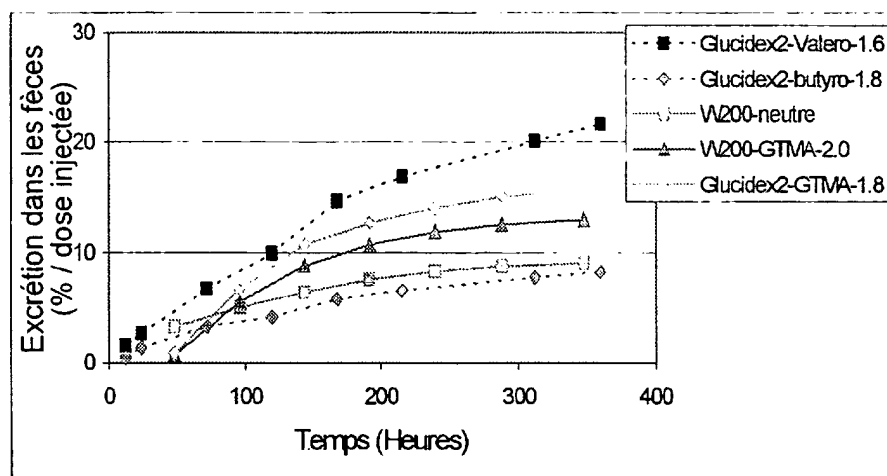
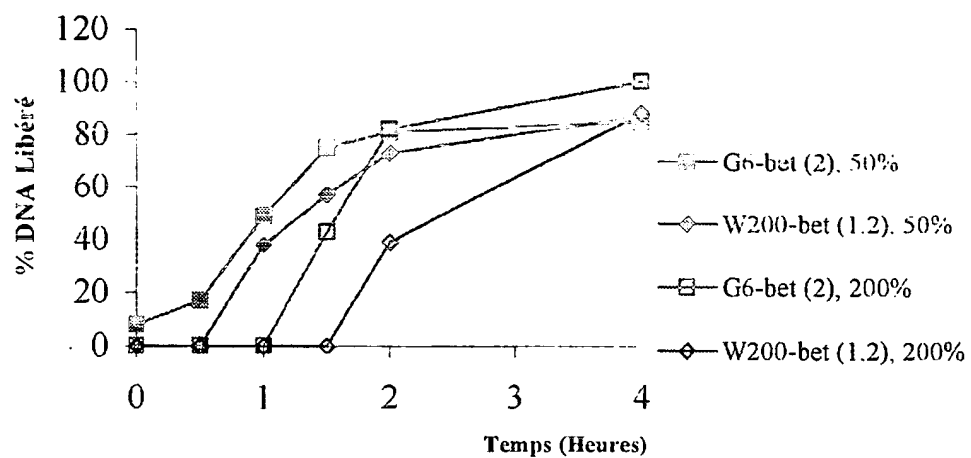
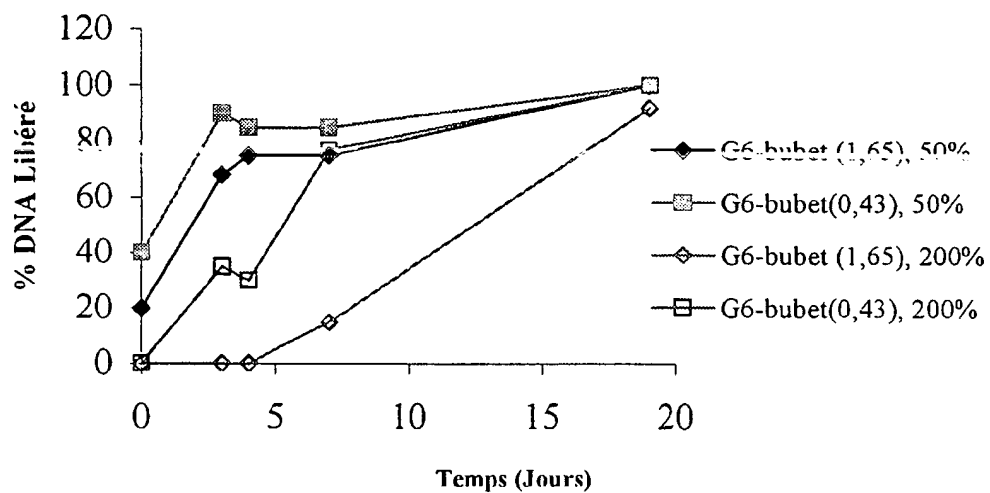


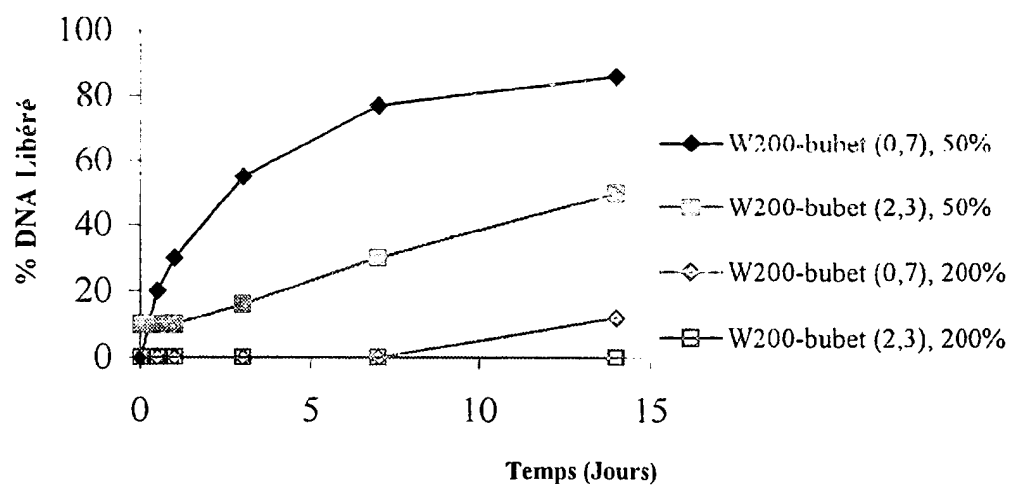
FIG.5

4/5

FIG.6FIG.7



5/5

FIG.8